植 物 分 类 与 资 源 学 报　2015, **37** (1): 29~37
Plant Diversity and Resources　DOI: 10.7677/ynzwyj201514048

核基因组微卫星标记揭示大理茶参与了普洱茶的驯化过程*

李苗苗[1,3], MEEGAHAKUMBURA M. Kasun[1,2,3],
严丽君[1,2,3], 刘　杰[1], 高连明[1**]

(1 中国科学院昆明植物研究所东亚植物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明　650201; 2 中国科学院西南野生生物种质资源库, 昆明　650201; 3 中国科学院大学, 北京　100049)

摘要: 利用 11 个核基因组微卫星标记对普洱茶 3 个居群、大理茶 3 个居群及过渡型大理茶 2 个居群共 104 株古茶树进行了遗传学分析。研究表明, 普洱茶、大理茶和过渡型大理茶居群的遗传多样性相对较低, 平均等位基因 (*Na*) 为 4.852, 平均香农多样性指数 (*I*) 为 1.17, 平均期望杂合度 (*He*) 和观测杂合度 (*Ho*) 分别为 0.59 和 0.52, 其中大理茶的遗传多样性水平低于普洱茶和过渡型大理茶。AMOVA 分析表明, 普洱茶和大理茶之间遗传分化显著 (F_{ST} = 0.305), 遗传变异主要在居群内 (分别为 93.51% 和 89.41%), 而居群间的遗传变异较低 (分别为 6.49% 和 10.59%)。主成分分析和 STRUCTURE 聚类分析均支持大理茶和普洱茶为不同的组, 过渡型大理茶主要由大理茶驯化而来, 并在栽培过程中与大理茶产生了遗传分化。在混栽的大理茶和普洱茶居群间存在由大理茶向普洱茶的明显基因渐渗, 证实了大理茶参与了普洱茶的驯化过程。最后, 讨论并提出了对大理茶和普洱茶古茶树资源保护的相关建议。

关键词: 普洱茶; 大理茶; 驯化; 微卫星标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q 16, Q 949.9　　**文献标志码**: A　　**文章编号**: 2095-0845(2015)01-029-09

Genetic Involvement of *Camellia taliensis* in the Domestication of *C. sinensis* var. *assamica* (Assimica Tea) Revealed by Nuclear Microsatellite Markers

LI Miao-miao[1,3], MEEGAHAKUMBURA M. Kasun[1,2,3], YAN Li-jun[1,2,3],
LIU Jie[1], GAO Lian-ming[1**]

(1 *Key Laboratory for Plant Diversity and Biogeography of East Asia*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 2 *Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 3 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: The levels of genetic diversity and population structure were assessed for 104 ancient tea plants from three *Camellia taliensis* populations, three *C. sinensis* var. *assamica* populations and two transitional populations of *C. taliensis* based on data from 11 nuclear microsatellite loci. In this study, a relative low genetic diversity was revealed for all three population groups. The average number of alleles (*Na*) was 4.85, the average Shannon's diversity index (*I*) was 1.17, the average expected heterozygosity (*He*) and observed heterozygosity (*Ho*) was 0.59 and 0.52 respectively, for the studied populations. The level of genetic diversity of *C. taliensis* was lower than for *C. sinensis* var. *assamica* and the transitional *C. taliensis*. An AMOVA analysis indicated a significant genetic differentiation (F_{ST}=0.305) between populations of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis*. Most of the genetic variation was partitioned within population of *C. sinensis* var. *assamica* (93.51%) and *C. taliensis* (89.41%), and a low par-

---

* 基金项目: 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (31161140350), 科技基础性工作专项项目 (2012FY110800)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: gaolm@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2014-03-21, 2014-04-14 接受发表
作者简介: 李苗苗 (1988-) 女, 硕士研究生, 主要从事茶树遗传资源评价研究。

tition among populations (6.49% and 10.59%, respectively). Populations of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* (*including the transitional populations of C. taliensis*) formed two distinct genetic clusters in a principal component analysis (PCoA) and in STRUCTURE clustering, which suggests that the transitional populations of *C. taliensis* originated mainly from *C. taliensis*, and then followed somewhat genetic differentiation during the process of domestication. Gene introgression was detected in the cultivated *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* from the same tea garden, and genetic material of *C. taliensis* apparently infiltrated into *C. sinensis* var. *assamica*. This study demonstrated that *C. taliensis* was genetically involved in the domestication of *C. sinensis* var. *assamica*. Finally, suggestions on how to protect the genetic resources of ancient tea plants are discussed on the findings in this study.

Key words: *Camellia sinensis* var. *assamica*; *Camellia taliensis*; Domestication; Genetic diversity; Microsatellite (SSR); STRUCTURE clustering

人类对主要谷类作物的驯化始于大约1万年前，通过长期的栽培实践在不同大洲驯化出多个适应农业系统的新品种（Doebley 等，2006；Sang 和 Ge，2013）。人类从野生植物中驯化了小麦、水稻和玉米等主要农作物，奠定了现代人类的粮食基础，极大促进了人类文明的发展。茶（*Camellia sinensis*（L.）Kuntze）是中国最早驯化的木本植物之一，在我国具有悠久的栽培历史（李璠，1984）。云南及其邻近地区的原住民有种植和利用茶叶的悠久历史（陈进和裴盛基，2003）。早在唐朝时期“茶马互市”的繁荣促使了茶马古道的形成，以普洱为中心将云南的茶叶运往国内的川藏、广西、贵州和湖南等省，以及国外的印度、尼泊尔和东南亚等国家（陈保亚，2004）。云南以得天独厚的自然条件，孕育了丰富的茶树种质资源，分布有为数众多的古茶园和野生大理茶古茶树群落（宋永全和苏祝成，2005；王平盛和虞富莲，2002），因此，云南常被认为是世界茶树的原产地中心（陈进和裴盛基，2003；虞富莲，1986）。

茶是当今世界三大饮料之一，也是全球最古老和最受欢迎的无酒精类饮料（Yao 等，2012）。大叶茶（*C. sinensis* var. *assamica*（Masters）Kitamura）又称普洱茶，是茶的一个变种，隶属于山茶属（*Camellia* L.）茶组（Sect. Thea），在全球范围内被广泛栽培（闵天禄，2000）。在亚洲部分地区，特别是在我国的云南，大理茶（*C. taliensis*（W. W. Smith）Melchior）等茶组植物也常被当地居民长期引种栽培（陈进和裴盛基，2003）。在云南西部现存的很多古茶园中，还保存有大理茶栽培居群，常与普洱茶混生，共同被作为茶饮植物使用（闵天禄，1992），有时也被当地居民当做“大树茶”混用。大理茶还保存着许多的野生居群，主要分布于云南西部的常绿阔叶林中，在当地也被称为“野茶”，但由于近年来对“野茶”的商业炒作和非法采伐，导致大理茶的野生居群遭受严重破坏，急需加强保护。

对普洱茶和大理茶遗传多样性和遗传结构已有较多研究（Balasaravanan 等，2003；Liu 等，2008；Liu 等，2010；Ji 等，2011），但鲜有涉及普洱茶和大理茶的驯化历史的研究。最近，Zhao 等（2014）基于14个微卫星（SSR）标记对大理茶的栽培起源进行了研究，发现野生大理茶的遗传多样性低于栽培或近期驯化的居群，认为人为破坏显著降低了大理茶野生种群的遗传多样性水平。Chen 等（2005）利用55个茶树形态学特征和4个生化特征数据，分析了大叶茶与茶组其它近缘种之间的系统发育关系，表明大理茶与普洱茶有更近的亲缘关系。王丽鸳等（2009）利用SSR数据构建了茶组12个种的遗传关系，表明普洱茶与大理茶遗传关系较近。在我们对云南茶树种质资源调查的过程中，发现有些茶园的茶树形态特征介于大理茶和普洱茶之间（如叶片等营养器官由无毛向有毛过渡，柱头5裂至3裂，子房由5室向3室过渡，花萼和幼果由无毛向有毛过渡等，本文称为过渡型大理茶），我们推测可能是大理茶与普洱茶之间的杂交或基因渐渗造成的；也可能是在普洱茶的驯化过程中，大理茶参与了普洱茶的驯化，但缺乏分子遗传学方面的证据。本研究利用11对共显性微卫星标记对普洱茶、大理茶及过渡型大理茶开展居群遗传学研究，旨在澄清：1）普洱茶、大理茶及过渡型大理茶的居群遗传结构和遗传多样性水平；2）大理茶是否参与了普洱茶的驯化栽培过程；3）基

于本文的研究结果，对普洱茶和大理茶古茶树的种质资源保护提出相应建议。

1　材料和方法

1.1　实验材料

本研究选取了分布于云南省的普洱茶 3 个居群，大理茶 3 个居群以及过渡型大理茶 2 个居群共计 104 株古茶树样品进行居群遗传学分析（居群的信息及来源见表 1）。其中，TMK 为野生大理茶居群，TWQ 和 TBW 为栽培的大理茶居群，分别与普洱茶的 WQ 和 BW 居群混生于同一茶园中。每个居群采集 9~20 株古茶树（树主干直径>15 cm），取新鲜健康的叶片用硅胶快速干燥作为分子材料保存，每个样品采集 2 份凭证标本，凭证标本保存于中国科学院昆明植物研究所标本馆（KUN）。

1.2　总 DNA 提取、引物筛选、PCR 产物扩增和分型

利用改良的 CTAB 法提取研究样品的总 DNA（刘杰和高连明，2011），并将 DNA 稀释为 30~50 ng·μL^{-1}的终浓度用于后续的 PCR 反应。从已发表的茶及其近缘种 SSR 位点中选取了 128 对片段大小在 120~350 bp 之间，微卫星区域多为 3 碱基至 6 碱基重复的引物进行初步筛选，最终筛选出 11 对扩增条带清晰、重复性好、多态性高的核基因组微卫星引物，然后合成荧光引物用于微卫星位点的分型检测（引物信息见表 2）。PCR 扩增反应为 20 μL 体系，包括 2 μL 10 × PCR buffer，0.4 μL dNTP mixture（2.5 mM），0.15 μL Taq polymerase（5 U·μL^{-1}），1 μL 正反引物（5 μM·L^{-1}），1 μL DNA 模板，加水至 20 μL。扩增反应程序为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，退火 30 s（引物退火温度见表 2），72 ℃延伸 45 s，共 32 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在 ABI 3730 xl 自动测序仪进行分型检测，所得数据用 Gene Mapper V.2.2.0 进行处理。

1.3　数据分析

数据按照 GenALEx V.6.4 软件格式要求在 Microsoft Excel 2010 进行编码和整理。利用软件 GENEPOP V.3.4（Rousset，2008，http://genepop.curtin.edu.au/）来计算每个位点对是否连锁不平衡（Linkage disequilibrium，LD），并计算在位点水平和居群水平上是否偏离哈迪温伯格平衡。利用 GenAlex 6.41（Peakall 和 Smouse，2006）软件计算以下遗传多样性参数：平均等位基因数目（*Na*），有效等位基因数目（*Ne*），观测杂合度（*Ho*）和期望杂合度（*He*），固定指数（*F*）。采用 ARLEQUIN V.3.5 软件（Excoffier 和 Lischer，2010）对每个位点的 F_{ST}及其显著度进行计算，并进行分子方差分析。

利用 MICROSATELLITE ANALYSER V.4.05（Dieringer 和 Schlötterer，2003）计算个体间的 Nei's 遗传距离矩阵；利用 GenAlex 6.41（Peakall 和 Smouse，2006）软件进行主成分（PCoA）分析。采用 STRUCTURE V.2.3（Pritchard 等，2000）对 104 个个体进行群体分组聚类分析，使用完整的 Bayesian 聚类方法来检验预先划分的居群与按照遗传背景进行的分组相一致的程度。该分析可将个体指派给不同的亚居群，并推算出居群最可能的聚类情况（*K*）。STRUCTURE 程序运行中的参数"Length of burn-in-period"为 100 000，"Number of MCMC Reps after Burnin"为 100 000，*K* 值定义为 1~8，每个 *K* 值运行 10 次。根据 Evanno 等（2005）所提出的方法，通过计算连续 *K* 值之间 Ln P（D）变化率的大小（Δ*K*）来做折线图选择最佳 *K* 值，即得群体遗传结构的分组数。此外，通过计算每个 *K* 值运行 10 次的 Ln P（D）找出最大的 L（*K*）值来确定最佳的分组（Vernesi 等，2003）。

2　实验结果

2.1　遗传多样性与遗传结构

本文采用 11 对微卫星引物对普洱茶、大理茶及过渡型大理茶 8 个居群共 104 个样品进行了分析，共检测到 107 个等位基因，每个位点拥有等位基因 5~16 个，平均为 9.73 个。在整体水平上，

表 1　本文所选居群的信息

Table 1　Information of the sampled populations in this study

居群 Population	居群大小 No. of samples	地理位置 Locality	纬度 Latitude	经度 Longitude	生境 Habitat	分类单元 Taxon
WQ	15	云南，昌宁，温泉	24°45′22.7″ N	99°45′32.8″ E	茶园	普洱茶 *C. sinensis* var. *assamica*
MK	15	云南，双江，勐库	23°42′2.0″ N	99°51′2.2″ E	茶园	普洱茶 *C. sinensis* var. *assamica*
BW	15	云南，澜沧，邦威	23°07′22.4″ N	99°55′59.7″ E	茶园	普洱茶 *C. sinensis* var. *assamica*
TWQ	10	云南，昌宁，温泉	24°45′22.7″ N	99°45′32.8″ E	茶园	大理茶 *C. taliensis*
TMK	10	云南，双江，勐库	23°41′48.4″ N	99°47′49.5″ E	原始森林	大理茶 *C. taliensis*
TBW	9	云南，澜沧，邦威	23°07′22.4″ N	99°55′59.7″ E	茶园	大理茶 *C. taliensis*
ZA	20	云南，龙陵，镇安	24°43′18.1″ N	98°46′59.6″ E	茶园	大理茶（过渡型）*C. taliensis*
TY	10	云南，昌宁，田园	24°46′48″ N	99°32′59.9″ E	茶园	大理茶（过渡型）*C. taliensis*

所有微卫星位点对之间为显著的连锁不平衡（LD）。在哈迪-温伯格平衡检测中，8 个居群在所有位点上显著偏离哈迪-温伯格平衡（$P<0.05$）。在居群水平上，平均等位基因数目（*Na*）平均为 4.85 个，其中普洱茶 MK 居群的平均等位基因数目最低（4.09），而普洱茶 BW 居群的最高（6.00）；有效等位基因数目（*Ne*）为 2.49～3.76，平均为 3.04 个；香农多样性指数（*I*）为 1.01～1.36，平均为 1.17；观测杂合度（*Ho*）和期望杂合度（*He*）平均分别为 0.52 和 0.59；固定指数（*F*）为-0.005～0.235，平均为 0.131，大理茶 TWQ 居群为负值（表 3）。

表 2 用于本文研究的 11 对 SSR 引物特征信息

Table 2 Characterization of the 11 SSR primers used in this study

位点 Locus	引物序列 Primer Sequence（5′-3′）	位点大小 Size range/bp	重复单元 Repeat Motif	退火温度 Ta ℃	文献来源 Literature Cited
TUGMS2-135	F：ATGCTAGCCATGGCAATACC R：CACACTGCACATGATGGTGA	230-290	（GAA）8	58	Sharma 等，2011
Ca8	F：TTCAATTACCCGCCAATCTC R：CCAATCTGGGAATTGAAGAAG	150-190	（CT）10	58	Hung 等，2008
P09	F：CAGGGTTGCAAGAAGTACCG R：ATCAACCGTATGGGCAAAAG	110-140	（TTC）n	65	金基强等，2006
S34	F：CTGAGGCTCATCAACGCATA R：GCATCTGTACAGCTCCTCCC	110-151	（AAG）15	61	Wu 等，2012
S76	F：GAGAAACAACAATAAAATGGAGGC R：AACCAGACGTTTGGAGCAAC	220-250	（ATA）9	62	Wu 等，2012
S87	F：GTATTGGGAGCGCAAGATCA R：GAGTCTTGACGGAGTCGAGG	110-150	（CAACAG）6	58	Wu 等，2012
TM134	F：TTCCGTGACTGATTTATGTG R：TTGAGACTCGGGGTTTT	215-251	（CAT）8	56	Yao 等，2012
TM179	F：GTCCCAGAAATCATAACG R：CGACAAGGGATTAGCAG	141-162	（TGA）8	58	Yao 等，2012
TM197	F：GAGGAGCATTAGCATCTT R：GGACCAGTACGAGTAGC	115-145	（AGG）7	59	Yao 等，2012
TM51	F：AATCATGCCCAAGGACATTC R：CAACCACTACCCATTTCACT	155-188	（GGT）6	60	Ma 等，2010
TM58	F：CATTATCCCTTTCCTTGTCCA R：GGAGGGAGTAGGAGGTGGTCT	252-288	（TCA）6	61	Ma 等，2010

表 3 8 个居群的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of the eight studies populations

POP	*N*	*Na*	*Ne*	*I*	*Ho*	*He*	*uHe*	*F*
WQ	15	5.73	3.31	1.32	0.53	0.63	0.65	0.211
MK	15	4.09	3.11	1.09	0.50	0.56	0.58	0.103
BW	15	6.00	3.76	1.36	0.57	0.65	0.67	0.178
ZA	20	5.55	3.08	1.25	0.55	0.62	0.63	0.121
TY	10	4.73	3.10	1.23	0.48	0.62	0.66	0.235
TWQ	10	4.46	2.84	1.07	0.53	0.55	0.57	-0.005
TMK	10	4.09	2.67	1.07	0.49	0.57	0.60	0.142
TBW	9	4.18	2.49	1.01	0.50	0.52	0.55	0.061
mean	13	4.85	3.04	1.17	0.52	0.59	0.61	0.131

附注：N，样本量大小；*Na*，平均等位基因数目；*Ne*，有效等位基因数目；*I*，香农多样性指数；*Ho*，观测杂合度；*He*，期望杂合度；*uHe*，无偏期望杂合度；*F*，固定指数

在将普洱茶和大理茶分组的情况下（不包括过渡型居群），AMOVA 分析表明有 24.41%的遗传变异来自普洱茶和大理茶居群间，而 69.54%的变异存在于居群内，仅有 6.05%的遗传变异存在组内的居群间（表 4）。普洱茶和大理茶之间的遗传分化系数（F_{ST}）为 0.305，遗传分化显著（$P<0.01$）。在普洱茶居群中，遗传变异主要分布在于居群内（93.51%），而居群间的遗传变异仅为 6.49%；大理茶居群的遗传变异式样与普洱茶相近，89.41%的遗传变异存在于居群内，而居群间的遗传变异较低，为 10.59%，居群间的遗传分化明显（$P<0.01$）。在居群水平上，普洱茶与大理茶居群间的遗传分化系数较高（0.245~0.393），其中居群 MK 与 TBW 之间的分化系数最高（$F_{ST}=0.393$），而普洱茶和大理茶种内居群间的分化系数则较低（0.047~0.083 vs. 0.082~0.139）。两个过渡型大理茶居群与普洱茶居群间的遗传分化（0.183~0.316）均大于同大理茶居群间的遗传分化（0.075~0.175）。

2.3　遗传结构与关系

普洱茶和大理茶（包括过渡型）在个体水平上的 PCoA 分析结果如图 1 所示，前三个坐标轴的遗传变异累积为 34.34%，第一和第二坐标轴可区分大理茶和普洱茶居群，以及栽培的和野生的大理茶居群（图 1：A）；而第一和第三坐标轴可区分大理茶、普洱茶和过渡型居群（图 1：B）。过渡型居群中有 3 个样品（ZA6、TY5 和 ZA7）聚于普洱茶样品的群集（Cluster）内（图 1）。

当 $K=2$ 时，L（K）和 ΔK 值均为最大值，表明 $K=2$ 为最佳分组（结果未展示）。STRUCTURE 的聚类分析表明（图 2），当 $K=2$ 时，普洱茶居群聚为一组（绿色），大理茶与过渡型居群聚为另一组。普洱茶 WQ 和 BW 居群的部分样品包含大理茶的遗传物质，而大理茶居群的遗传背景较一致，过渡型居群中有少数样品包括了普洱茶的遗传物质。当 $K=3$ 时，普洱茶居群的分组与 $K=2$ 时的结果相同，仍聚为一组，而大理茶和过渡型大理茶居群分化成两组，它们分别聚为不同的组（蓝色和红色），但大理茶 TWQ 居群显示为杂合状态，即包含了 50%以上的过渡型大理茶居群的遗传物质（蓝色）。

3　讨论

3.1　普洱茶和大理茶的居群遗传多样性与遗传分化

普洱茶和大理茶是云南省重要的经济作物，很多学者对普洱茶和大理茶的遗传多样性和遗传结构进行过研究（季鹏章等，2009；Ji 等，2011；刘阳等，2010；Liu 等，2012；Zhao 等，2014；Yao 等，2012）。本研究基于 11 个 SSR 位点对普洱茶和大理茶居群的遗传多样性水平进行了分析，结果表明，普洱茶（$Ho=0.53$）和大理茶（$Ho=0.50$）居群的遗传多样性相对较低，低于基于 80 种植物的观察杂合度平均值（$Ho=0.58$），也低于长寿命和异交植物的平均观察杂合度（$Ho=0.63$）（Nybom，2004），但与 Zhao 等（2014）对大理茶遗传多样性的研究结果一致（$Ho=0.502$）。

表 4　普洱茶和大理茶居群基于 11 个微卫星位点的 AMOVA 分析

Table 4　Results of AMOVA analysis of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* populations based on 11 microsatellites

Group	Source of variation	*d.f.*	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	F_{ST}
Define groups	Among groups	1	92.929	1.17302Va	24.41	0.305*
	Among populations within groups	4	42.029	0.29062Vb	6.05	
	Within populations	142	474.556	3.34194Vc	69.54	
	Total	147	609.514	4.80558		
C. sinensis var. *assamica*	Among populations	2	21.389	0.24084Va	6.49	0.065
	Within populations	87	301.833	3.46935Vb	93.51	
	Total	89	323.222	3.71019		
C. taliensis	Among populations	2	20.64	0.37180Va	10.59	0.106*
	Within populations	55	172.722	3.14040 Vb	89.41	
	Total	57	193.362	3.5122		

* $P<0.01$

普洱茶和大理茶均为栽培植物，这可能由于在长期栽培驯化过程中丢失了部分遗传多样性而导致的（Doebley 等，2006），如水稻（Zhu 等，2007）、玉米（Tenaillon 等，2004）等在驯化过程中均丧失了部分遗传多样性。本研究中，普洱茶和过渡型大理茶比大理茶居群拥有更高的遗传多样性（如有效等位基因数目，香农多样性指数和期望杂合度等参数）（表 3），与刘阳等（2010）基于叶绿体 RPL32-TRNL 核苷酸变异的结果一致。栽培的大理茶通常来自大理茶的野生群体，通过移栽或采集种子进行繁殖和栽培，因此野生的大理茶居群（TMK）与栽培居群（TWQ 和 TBW）的遗传多样性相近；而普洱茶和过渡型茶树来源复杂，可能在栽培和驯化的过程中通过杂交渗入了

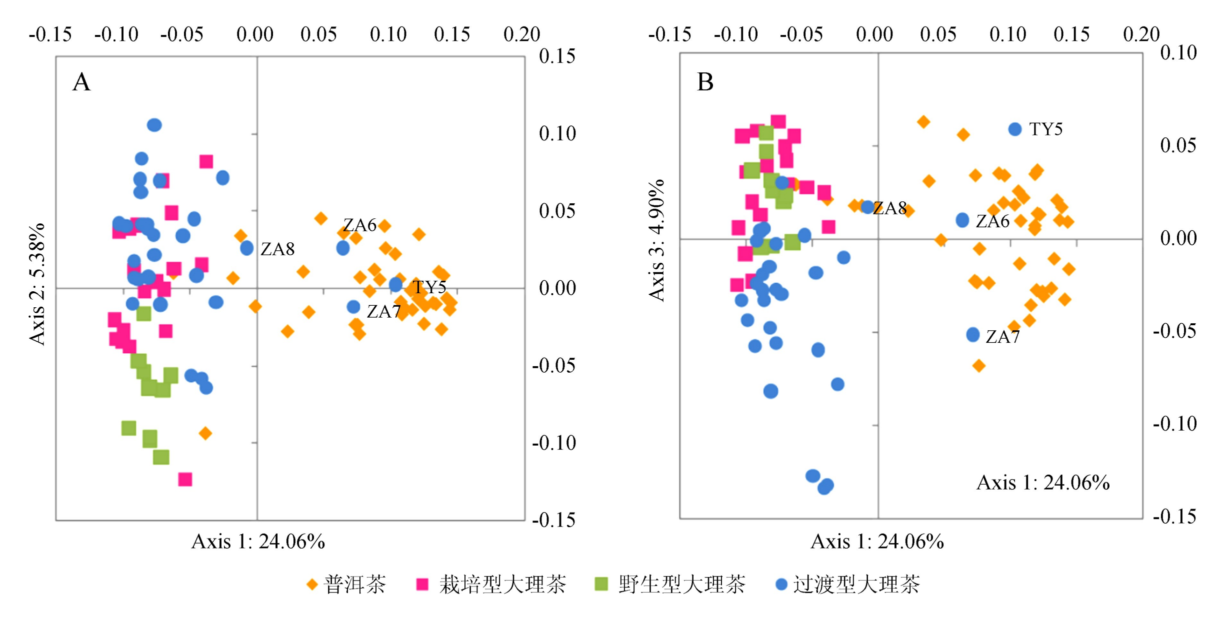


图 1 基于 11 个微卫星位点的 8 个群的 PCoA 分析。A. 第一与第二坐标轴之间的变异；B. 第一与第三坐标轴之间的变异

Fig. 1 Scatter plot for the principal component analysis (PCoA) of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* populations based on 11 SSR loci. A. variation between axis 1 and axis 2; B. variation between axis 1 and axis 3

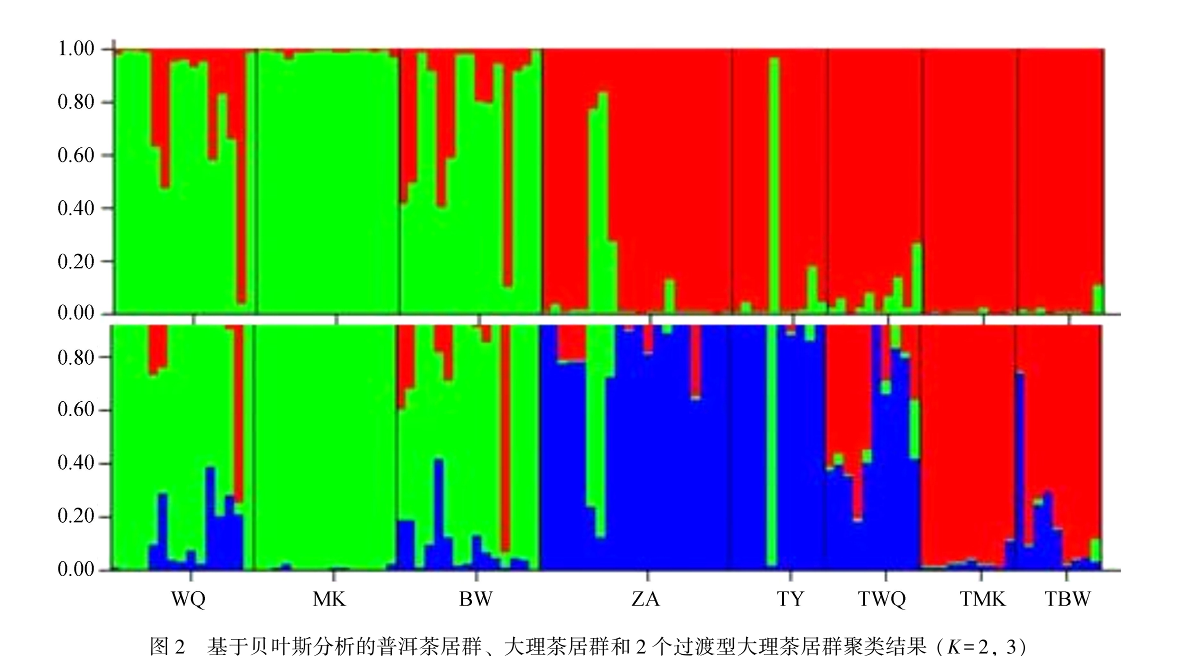


图 2 基于贝叶斯分析的普洱茶居群、大理茶居群和 2 个过渡型大理茶居群聚类结果（K=2，3）

Fig. 2 Bayesian inference of the number of clusters (K=2 and 3) for the *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* (including transitional populations) populations analyzed by STRUCTURE

其它茶种的种质，导致普洱茶和过渡型茶树的遗传多样性增加，这也得到了 STRUCTURE 分析结果的支持。

AMOVA 分析结果表明，普洱茶和大理茶的遗传变异主要分布在居群内（分别为 93.51%和 89.41%），而居群间的遗传变异则较低，如普洱茶仅有 6.49%的遗传变异发生在居群间，与刘阳等（2010）基于叶绿体基因片段的研究，Ji 等（2011）基于 ISSR 标记对普洱茶居群遗传学研究，季鹏章等（2009）基于 AFLP 标记的研究和 Zhao 等（2014）基于 SSR 标记对大理茶居群遗传学研究等结果一致。这可能是因为普洱茶和大理茶均为异交、长寿命的木本植物，导致居群内遗传变异增加，而居群间的遗传分化降低（Hamrick 和 Godt，1996）。普洱茶与大理茶之间具有显著的遗传分化（$F_{ST}=0.305$），明显高于大理茶种内居群间的遗传分化系数（$F_{ST}=0.153$，Zhao 等，2013）和异交物种遗传分化系数的平均值（$F_{ST}=0.22$，Nybom，2004）。普洱茶与大理茶居群间虽然存在一定的基因流，但普洱茶与大理茶应为两个完全不同的种（遗传实体），也得到了本文 STRUCTURE 和主成分分析结果的支持，而与刘阳等（2010）基于叶绿体片段的结果不同。STRUCTURE 和主成分分析结果表明两个过渡型居群与大理茶和普洱茶也存在一定的遗传分化，但与大理茶居群的遗传关系更近。可能是由于过渡型居群与大理茶和普洱茶居群存在一定的地理距离，导致群体间发生遗传分化，但并不排除过渡型茶树在长期的栽培驯化过程中形成独特的遗传实体而发生遗传分化。

3.2　大理茶种质资源参与了普洱茶的驯化过程

野生茶树资源是茶种资源创新的重要材料（孙雪梅等，2012）。Zhao 等（2014）基于 SSR 标记研究了大理茶的栽培起源问题，认为栽培大理茶从野生种群中多次驯化而来。分子遗传学方法（如 SSR 标记等）可用以研究作物的起源与驯化历史（Harter 等，2004；Kilian 等，2007）。杨崇仁等（2008）根据大理茶在栽培驯化过程中出现了不少的变异类型，且有的类型具有大叶茶的形态特征，推测大理茶可能是普洱茶的野生基源之一。根据本文 STRUCTURE 聚类分析结果，证明大理茶种质的确参与了普洱茶的驯化过程。

在 STRUCTURE 的聚类分析中，普洱茶和大理茶（含过渡型大理茶）分为两组（图 2，$K=2$）。采自云南省双江县勐库镇大户寨村的普洱茶 MK 居群（古茶园，海拔 1 750 m，不与大理茶混栽）和野生大理茶 TMK 居群（原始森林中，海拔 2 480 ~2 630 m）均具有各自纯的遗传背景（$K=2$，3），表明在自然情况下两个种间并无基因相互渗入。与大理茶居群生长在同一茶园的普洱茶居群 WQ 和 BW 有多个个体渗入了大理茶的遗传物质，而大理茶居群基本上没有普洱茶的遗传物质渗入，表明由大理茶向普洱茶发生了基因渐渗，也就是说大理茶参与到了普洱茶的驯化栽培过程，但也不排除大理茶与普洱茶之间发生自然杂交和基因渐渗的可能。在过渡型大理茶居群（ZA 和 TY）中，部分样品含大理茶和普洱茶共同的遗传物质（$K=2$），表明过渡型大理茶很可能是由大理茶和普洱茶驯化而来，或由大理茶和普洱茶通过杂交渐渗形成，在过渡型大理茶中以大理茶的遗传组成为主，可能在栽培驯化过程中发生了遗传分化（$K=3$）。在过渡型大理茶中有三个样品（ZA6、ZA7 和 TY5）在 PCoA 分析中与普洱茶的样品聚成一个群集（图 1），包含了大部分普洱茶的遗传组成（图 2），形态上与普洱茶也更相近，而其它样品在形态上则更像大理茶，在遗传上也更近于大理茶。由此可见，微卫星标记可作为茶树品种鉴定的重要工具之一。

3.3　对古茶树种质资源保护的建议

云南具有悠久的茶树栽培和利用历史，现在还保存有大量明清时期建立的普洱茶的古茶园，被认为是茶的起源中心（虞富莲，1986）。野生的大理茶主要分布于云南西部、西南部和毗邻的缅甸北部与泰国北部（闵天禄，2000），在很多地方还生长着上千年的野生大理茶群落。在澜沧江流域还分布有一些栽培的大理茶古茶园。这些野生大理茶和栽培的古茶树资源不乏优质的特异性状，不仅可作为茶树遗传改良和新品种培育的宝贵遗传资源，也是研究茶树起源与驯化的重要素材（刘阳等，2010），因此具有非常重要的保护价值。然而，由于大面积毁林开荒和现代化茶园替代种植，导致近几十年古茶园的面积急剧减少。此外，加之近年来对“野茶”和“大树茶”的商业炒作，对野生大理茶的非法采集和盗伐时

有发生，导致大理茶的野生资源遭受严重破坏。

通过本文对普洱茶、大理茶和过渡型大理茶8个居群104株古茶树遗传多样性的分析，所有样品具有不同的基因型，拥有丰富的基因资源和育种潜力，可作为茶树品种遗传改良和新品种培育的宝贵种质资源，也是研究茶树起源与驯化的重要素材，加强对这些珍贵种质资源的保护和可持续利用意义重大，急需加强保护。由于云南古茶树分布范围广，面积大，生长环境差异大，因此，建议以就地保护为主进行保护。对于特别重要（如具有优异的特异性状）或保护现状不好的古茶树，建议采取迁地保护策略，通过采集种子进行繁殖或无性繁殖（如扦插等）的方式进行抢救性保护，建立重要茶树种质资源圃。同时，国家或政府可出台相应的保护措施，对保护好的单位或个人给予一定的经济补尝；另外，加强执法力度，打击非法盗采、盗伐等破坏行为。

致谢 感谢西南野生生物种质库分子生物学实验中心的同事在实验过程中给予的帮助。感谢张玉霄博士在野外采样过程中的帮助。爱丁堡皇家植物园 Michael Möller 博士帮助修改英文摘要。

〔参 考 文 献〕

李璠, 1984. 中国栽培植物发展史［M］. 北京：科学出版社

闵天禄, 2000. 世界山茶属的研究［M］. 昆明：云南科技出版社

Balasaravanan T, Pius PK, Kumar RR *et al*., 2003. Genetic diversity among south Indian tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) using AFLP markers［J］. *Plant Science*, **165**: 365—372

Chen BY（陈保亚）, 2004. The origination of tea-horse road［J］. *Thinking*（思想战线）, **30**: 44—50

Chen J, Wang P, Xia Y *et al*., 2005. Genetic diversity and differentiation of *Camellia sinensis* L. (cultivated tea) and its wild relatives in Yunnan province of China, revealed by morphology, biochemistry and allozyme studies［J］. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **52**: 41—52

Chen J（陈进）, Pei SJ（裴盛基）, 2003. Studies on the origin of tea cultivation［J］. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究）, **16** (suppl.): 33—40

Dieringer D, Schlötterer C, 2003. Microsatellite analyser (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets［J］. *Molecular Ecology Notes*, **3**: 167—169

Doebley JF, Gaut BS, Smith BD, 2006. The molecular genetics of crop domestication［J］. *Cell*, **127**: 1309—1321

Evanno G, Regnaut S, Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study［J］. *Molecular Ecology*, **14**: 2611—2620

Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows［J］. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 564—567

Hamrick JL, Godt MJW, 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species［J］. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **351**: 1291—1298

Harter AV, Gardner KA, Falush D *et al*., 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America［J］. *Nature*, **430**: 201—205

Hung CY, Wang KH, Huang CC *et al*., 2008. Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from *Camellia sinensis* in Taiwan using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA)［J］. *Conservation Genetics*, **9**: 779—781

Ji PZ（季鹏章）, Wang YG（汪云刚）, Jiang HB（蒋会兵）*et al*., 2009. Genetic diversity of *Camellia taliensis* from Yunnan province of china revealed by AFLP analysis［J］. *Journal of Tea Science*（茶叶科学）, **29**: 329—335

Ji PZ, Li H, Gao LZ *et al*., 2011. ISSR diversity and genetic differentiation of ancient tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) plantations from china: implications for precious tea germplasm conservation［J］. *Pakistan Journal of Botany*, **43**: 281—291

Jin JQ（金基强）, CuiHR（崔海瑞）, ChenWY（陈文岳）*et al*., 2006. Data mining for SSRS in ESTS and development of EST-SSR marker in tea plant (*Camellia sinensis*)［J］. *Journal of Tea Science*（茶叶科学）, **26**: 17—23

Kilian B, Özkan H, Walther A *et al*., 2007. Molecular diversity at 18 loci in 321 wild and 92 domesticate lines reveal no reduction of nucleotide diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) domestication: implications for the origin of agriculture［J］. *Molecular Biology and Evolution*, **24** (12): 2657—2668

Liu Y（刘阳）, Yang SX（杨世雄）, Gao LZ（高立志）, 2010. Comparative study on the chloroplast RPL32-TRNL nucleotide variation within and genetic differentiation among ancient tea plantations of *Camellia sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* (theaceae) from yunnan, China［J］. *Plant Diversity and Resources*（植物资源与分类学报）, **32**: 427—434

Liu Y, Yang SX, Ji PZ *et al*., 2012. Phylogeography of *Camellia taliensis* (Theaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary history and conservation［J］. *BMC Evolution Biology*, **12** (92): 1—13

Liu Z（刘振）, Wang XC（王新超）, Zhao LP（赵丽萍）*et al*., 2008. Genetic diversity and relationship analysis of tea germplasms originated from south western China based on EST-SSR［J］. *Molecular Plant Breeding*（植物分子育种）, **6**: 100—110

Liu J（刘杰）, Gao LM（高连明）, 2011. Comparative analysis of

three different methods of total DNA extraction used in *Taxus* [J]. *Guihaia* (广西植物), **31**: 244—249

Ma JQ, Zhou YH, Ma CL *et al.*, 2010. Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SSR markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **97**: e153—e156

Min TL (闵天禄), 1992. A revision of *Camellia* Sect. Thea [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **14**: 115—132

Nybom H, 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Molecular Ecology*, **13**: 1143—1155

Peakall R, Smouse PE, 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288—295

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, **155**: 945—959

Rousset F, 2008. Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Notes*, **8**: 103—106

Sharma H, Kumar R, Sharma V *et al.*, 2011. Identification and cross-species transferability of 112 novel unigene-derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *American Journal of Botany*, **98**: e133—e138

Sang T, Ge S, 2013. Understanding rice domestication and implications for cultivar improvement [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**: 139—146

Song YQ (宋永全), Su ZC (苏祝成), 2005. Status Quo of ancient tea tree resources of Yunnan and measures for protection [J]. *Forest Inventory and Planning* (林业调查规划), **30**: 108—111

Sun XM (孙雪梅), Hang M (黄梅), Liu BY (刘本英) *et al.*, 2012. Geographic distribution and morphological diversity of wild tea germplasms from Yunnan [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **28**: 277—288

Tenaillon MI, U'Ren J, Tenaillon O *et al.*, 2004. Selection versus demography: a multilocus investigation of the domestication process in maize [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **21**: 1214—1225

Vernesi C, Crestanello B, Pecchioli E *et al.*, 2003. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis [J]. *Molecular Ecology*, **12**: 585—595

Wang PS (王平盛), Yu FL (虞富莲), 2002. The geographic distribution, diversity and utilization of wild tea Camellias in China [J]. *Journal of Tea Science* (茶叶科学), **22** (2): 105—108

Wang LY (王丽鸳), Liu BY (刘本英), Jiang YH (姜燕华) *et al.*, 2009. Phylogenetic analysis of interspecies in section Thea through SSR markers [J]. *Journal of Tea Science* (茶叶科学), **29**: 341—346

Wu H, Chen D, Li J *et al.*, 2012. De Novo characterization of leaf transcriptome using 454 sequencing and development of EST-SSR markers in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, **31**: 524—538

Yang CR (杨崇仁), ZhangYJ (张颖君), Gao DF (高大方) *et al.*, 2008. Genetic diversity evaluation of *Camellia taliensis* and origin of *C. sinensis* var. *assamica* [J]. *Tea Science and Technology* (茶叶科学技术), **3**: 1—4

Yao MZ, Ma CL, Qiao TT *et al.*, 2012. Diversity distribution and population structure of tea germplasms in China revealed by EST-SSR markers [J]. *Tree Genetics & Genomes*, **8**: 205—220

Yu FL (虞富莲), 1986. Discusson of tea tree and origin center of origin [J]. *Journal of Tea Science* (茶叶科学), **6**: 1—8

Zhao DW, Yang JB, Yang SX *et al.*, 2014. Genetic diversity and domestication origin of tea plant *Camellia taliensis* (Theaceae) as revealed by microsatellite markers [J]. *BMC Plant Biology*, **14**: 1—12

Zhu Q, Zheng X, Luo J *et al.*, 2007. Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: severe bottleneck during domestication of rice [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 875—888